

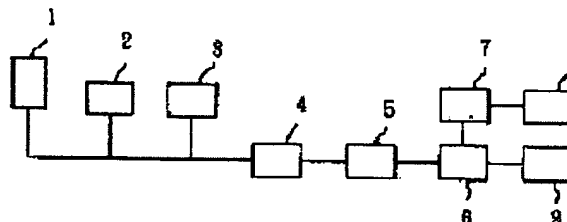
**QUANTITATIVE-MEASURING METHOD AND QUANTITATIVE- MEASURING
DEVICE FOR SPECIMEN**

Patent number: JP2000088852
Publication date: 2000-03-31
Inventor: SOMA KAZUNORI; SAITO TSUTOMU; SAITO TOMOO
Applicant: FUJIREBIO KK
Classification:
- international: G01N33/543; G01N33/543
- european:
Application number: JP19980261532 19980916
Priority number(s): JP19980261532 19980916

Report a data error here

Abstract of JP2000088852

PROBLEM TO BE SOLVED: To easily realize a quantitative measurement of a substance to be detected by measuring a starting flowing length of an aggregation pattern of a magnetic particle. **SOLUTION:** An automatic indirect aggregation immuno-measuring device is constituted, for example, by a micro-plate supplying device 1; a specimen dispensing device 2; a reagent dispensing device 3; a specimen and a reagent stirring device 4; a forced precipitation device 5 for forcedly precipitating a magnetic particle; an inclination device 6 for inclining the micro-plate; a reading device 7 for reading a starting flowing length of the magnetic particle; a concentration determination device 8 for applying the length read to a calibration curve and calculating a concentration of the specimen; and a recovery device 9 for recovering the micro-plate used. A magnetic particle in the reagent is forcedly precipitated by a magnetic force and a container is inclined at a state of releasing it from a magnetic force. Thereby, the magnetic particle is flowed and an aggregation pattern is formed and then, a starting flowing length of the aggregation pattern is measured. The measured value is applied to the calibration curve previously prepared to determine a concentration of the object substance in the specimen.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-88852

(P2000-88852A)

(43)公開日 平成12年3月31日(2000.3.31)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/543	5 8 1	G 0 1 N 33/543	5 8 1 F
	5 4 1		5 4 1 A

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 4 頁)

(21)出願番号	特願平10-261532	(71)出願人	000237204 富士レビオ株式会社 東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号
(22)出願日	平成10年9月16日(1998.9.16)	(72)発明者	相馬 和典 東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号 富士レビオ株式会社内
		(72)発明者	斎藤 勉 東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号 富士レビオ株式会社内
		(72)発明者	斎藤 智雄 東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号 富士レビオ株式会社内

(54)【発明の名称】 検体の定量方法及び定量装置

(57)【要約】

【構成】 本発明は、磁性粒子を用いた間接凝集免疫測定方法において、磁力により磁性粒子を強制的に沈降させ、次いで磁力から解放した状態で容器を傾斜させることによって磁性粒子の流れだしの凝集パターンを形成させ、形成された該凝集パターンの流れだしの長さを測定し、該測定値を予め作成した検量線に適用し、検体中の測定対象物質を濃度で表すことを特徴とする検体の定量方法及び該方法による検体の定量装置である。

【効果】 本発明の定量方法は、簡便、安価かつ多数の検体を処理することができ、その測定は従来の間接凝集免疫測定ではできない定量を行うことができる。そのため、本発明により、前記利点に加えさらに検査結果の精度管理や治療の予後観察を行うこともできる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】磁性粒子を用いた間接凝集免疫測定方法において、磁力により磁性粒子を強制的に沈降させ、次いで磁力から解放した状態で容器を傾斜させることによって磁性粒子の流れだしの凝集パターンを形成させ、形成された該凝集パターンの流れだしの長さを測定し、該測定値を予め作成した検量線に適用し、検体中の測定対象物質を濃度で表すことを特徴とする検体の定量方法。

【請求項2】磁性粒子を用いた間接凝集免疫測定方法において、検体溶液と試薬とを反応させる反応容器、磁力により反応容器中の磁性粒子を強制的に沈降させる手段、磁性粒子の流れだしを形成するために凝集パターンを形成するために容器を傾斜させる手段、形成された凝集パターンの流れだしの長さを測定する手段、予め作成した検量線を記憶している記憶装置及び前記測定した流れだしの長さを検量線に適用し検体中の測定対象物の濃度を算出する手段を有することを特徴とする検体の定量装置。

【請求項3】希釈液により検体を希釈する手段を備えた請求項2に記載の検体の定量装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、磁性粒子を用いた間接凝集免疫測定方法における検体の定量方法及び該方法による検体の定量装置に関する。

【0002】

【従来の技術】臨床検査において使用される測定方法である間接凝集免疫測定方法は、安価でかつ簡便に測定を行うことができるため、長い間臨床検査の分野で使用されている。しかし、この間接凝集免疫測定方法はいわゆる定性的な測定であり、その測定は測定値が基準値の上か下かにより陽性・陰性を決定するもので測定対象物の存在の有無の判別に留まるものである。

【0003】該定性測定の改良方法として、検体について例えば2°希釈列、3°希釈列、・・・等の任意の希釈列を作成し、該希釈列について測定を行い、その陽性と判定される最大希釈階乗値をもって表現する測定方法が考えだされ、それが現在主として使用されている。該測定方法は、その結果がある測定濃度の範囲で表されるため前記定性測定と区別する理由で定量測定と呼ばれることがあるが、濃度として表すことができないため真の定量方法とはいいがたく、以下、本明細書において該方法を半定量方法と称する。半定量方法としては、特開平3-191864号公報、特開平6-324041号公報、特開平6-324042号公報に記載されている磁性粒子を利用した測定方法及び測定装置が知られている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】前記半定量方法は、簡便、安価かつ多数の検体を処理することができる点で優

れているものの、その結果には幅があるため、検査結果の精度管理や治療の予後観察に用いることには充分ではなかった。そこで、簡便、安価かつ多数の検体を処理することができる利点を残したまま、さらに定量を行うことができる測定方法が望まれていた。そこで、本願発明者らは、検体の定量測定を行うことができる定量方法及び該定量方法に用いることができる定量装置を提供することを課題とした。

【0005】

10 【課題を解決するための手段】本願発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討した結果、間接凝集免疫測定において、予め濃度既知の標準液について測定した結果を検量線として表し、測定検体について同様に測定を行い、得られた値を検量線にあてはめることにより検体の濃度を測定することができる検体の定量方法を見出し本発明を完成するに至った。本発明により、定量することが困難であった間接凝集免疫測定方法における定量測定を容易に実施することが可能となった。

20 【0006】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の一つは、磁性粒子を用いた間接凝集免疫測定方法において、磁力により磁性粒子を強制的に沈降させ、次いで磁力から解放した状態で容器を傾斜させることによって磁性粒子の流れだしの凝集パターンを形成させ、形成された該凝集パターンの流れだしの長さを測定し、該測定値を予め作成したパターンの長さに関する検量線に適用し、検体中の測定対象物質を濃度で表すことを特徴とする検体の定量方法である。

30 【0007】本発明の一つである検体の定量方法においては、まず検体の測定を行う前に、検量線作成のために既知濃度の標準液に関して間接凝集免疫測定を行う。ここで用いる間接凝集免疫測定は、標準液と試薬を抗原抗体反応により複合体を形成させた後、磁力により試薬中に含まれている磁性粒子を強制的に沈降させ、次いで磁力から解放した状態で容器を傾斜させることによって磁性粒子を流し出し凝集パターンを形成させ、該凝集パターンの流れだしの長さを測定することにより達成される。

40 【0008】次に、標準液に関して得られた流れだしの長さや検体中の測定物質の濃度との関係を求め、該関係について検量線を作成する。そして、測定検体について前記標準液と同様に間接凝集免疫測定を行い、得られた磁性粒子の流れだしの長さを前記検量線に適用し、検体中の被測定物質の濃度を求める。

50 【0009】標準液は、検体と同一の測定物質を含んだ任意の濃度に適宜調製することで作成される。検量線は、濃度の異なる複数の前記標準液についてそれぞれ特定値を測定し、濃度と特定値の関係を求めることにより作成することができる。測定物質としては、間接凝集免疫測定方法に通常用いることができる抗原又は抗体を用いることができる。

【0010】本発明に用いる磁性粒子としては、磁性体粒子、磁性体を含んでなるゼラチン粒子（特開昭59-195161号公報参照）、磁性体を血清アルブミンやポリマー等で被覆した粒子等を挙げることができ、それぞれ強磁性体を用いることが強制的な沈降を促進させることから好ましい。

【0011】本発明の測定に用いる検体としては、従来行われていた半定量方法で用いられる血清、尿、体液等を用いることができる。

【0012】本測定方法等の磁性粒子の流れだしを測定する方法においては、検体濃度が濃いと磁性粒子の流れだしがほとんど起こらないため濃度量として表すことができないが、その場合には検体を希釈することによって濃度量として表すこと、すなわち定量が可能となる。その検体濃度が $7\text{ ng/mL} \sim 45\text{ ng/mL}$ の場合には良好に定量を行うことができ、該検体濃度に対応した磁性粒子の流れだしの長さは $3.75\text{ mm} \sim 2.10\text{ mm}$ である。よって、測定する場合に予め原検体と希釈検体とを用意し、複数の濃度において測定をすることにより広い検量域の定量を行うことができる。

【0013】次に、本発明のもう一つは、磁性粒子を用いた間接凝集免疫測定方法において、検体溶液及び試薬を受容する容器、磁力により反応容器中の磁性粒子を強制的に沈降させる手段、磁性粒子の流れだしを形成するために凝集パターンを形成するために容器を傾斜させる手段、形成された凝集パターンの流れだしの長さを測定する手段、予め作成した検量線を記憶している記憶装置及び前記測定した流れだしの長さを検量線に適用し検体中の測定対象物の濃度を算出する手段を有することと特徴とする検体の定量装置である。

【0014】本発明の定量装置は、検体及び試薬を受容する容器、該試薬の磁性粒子を磁力により沈降させる手段、該容器を傾斜させる手段、該磁性粒子の流れだしの長さを測定する手段、検量線の記憶装置及び測定した長さを検量線に適用することにより測定対象物の濃度を算出する手段が必須のものである。より検量域の広い測定を行うため及び自動化による効率良い測定を行うためには、さらに検体を希釈する手段を設けることが好ましい。検体中の測定対象物の濃度を算出する手段としては、コンピュータ等の通常数値計算を行うことができる計算機等を挙げることができる。

【0015】本発明の検体及び試薬を受容する容器としてはポリスチレン樹脂、ABS樹脂、ガラス等の材質を用いたU字型又はV字型の容器等を使用することができる。これら容器の大きさは問わないが、大量の検体を処理し、取扱いが容易であり、鮮明な像を得るためには、ポリスチレン製のV字型マイクロプレートを用いることが好ましい。

【0016】また、磁性粒子を強制沈降させるものとしては、永久磁石や電磁石等をの磁石を用いることができ

る。

【0017】また、流れだしの長さを測定する手段としては、光センサー、ラインセンサー、CCDカメラによる画像処理等を用いた手段を挙げることができる。

【0018】これを例えば、全自動の間接凝集免疫測定装置として使用する際には、図3に示すように、マイクロプレート供給装置1、検体分注装置2、試薬分注装置3、検体及び試薬攪拌装置4、マイクロプレート底部に磁性粒子を強制的に沈降させる強制沈降装置5、マイクロプレートを傾斜した状態にする傾斜装置6、磁性粒子のマイクロプレートからの流れだしの長さ読み取り装置7、読み取った流れだしの長さを検量線に適用し、検体の濃度を算出する濃度決定装置8及び使用済みのマイクロプレートを回収するマイクロプレート回収装置9を組み合わせる構成することができるが、これは本発明の一実施例であり、本発明を何ら限定するものではない。

【0019】

【実施例】以下、本発明を実施例及び参考例によりさらに詳細に説明する。

【0020】（実施例1）検体希釈液として、リン酸緩衝溶液 $25\text{ }\mu\text{L}$ を第2ウェル及び第3ウェルに分注し、次に第1ウェルにヘモグロビン濃度 40 ng/mL の溶液を $30\text{ }\mu\text{L}$ 分注した。第1ウェルから $5\text{ }\mu\text{L}$ を分取し、第2ウェルへ移し攪拌して第1ウェルに対して6倍希釈の溶液を調製した。次に第2ウェルから $5\text{ }\mu\text{L}$ を分取し、第3ウェルへ移し攪拌して第1ウェルに対して36倍希釈の溶液を調製した。ヘモグロビン濃度 120 ng/mL 、 360 ng/mL の溶液についても同様に希釈検体を調製した。調製した希釈検体のうちヘモグロビン濃度 40 ng/mL 希釈列の第1ウェル（ 40 ng/mL ）、 120 ng/mL 希釈列の第2ウェル（ 20 ng/mL ）、 360 ng/mL 希釈列の第3ウェル（ 10 ng/mL ）の3つの希釈検体をそれぞれ次の測定に使用した。それぞれの希釈検体が入ったウェルに抗ヘモグロビン抗体が感作された磁性粒子（以下、感作粒子と称する。） $25\text{ }\mu\text{L}$ を分注し、5分間攪拌することによって感作粒子とヘモグロビンとを十分反応させ、次いで1分間磁力によって磁性粒子をウェルの底部へ強制的に沈降させ、磁力から解放した状態でウェルを 60° に2分間傾斜し凝集体をウェル底部から流れださせ、その流れだしの長さをそれぞれのウェルについて測定した。得られたヘモグロビン濃度と磁性粒子の流れだしの長さとの関係を求め片対数のグラフにプロットし検量線とした（図1参照）。

【0021】（実施例2）実施例1において標準液の希釈と同様の方法を用いて、測定検体についての希釈検体を調製した。つまり、第1ウェルには原検体、第2ウェルには6倍希釈の検体、第3ウェルには36倍希釈の検体が調製されたことになる。第1ウェルから第3ウェルそれぞれのウェルに感作粒子 $25\text{ }\mu\text{L}$ を分注し、5分間

攪拌することによって感作粒子とヘモグロビンとを反応させ、次いで1分間磁力によって磁性粒子をウェルの底部へ強制的に沈降させ、磁力から解放した状態でマイクロプレートを用いて60°に2分間傾斜し凝集体をウェル底部から流れださせ、その粒子の流れだしの長さをそれぞれのウェルについて測定した。測定結果は、第1ウェルが1.90mm、第2ウェルが1.90mm、第3ウェルが3.50mmであった。第3ウェルの値を実施例1で作成した検量線に適用したところ、ヘモグロビン濃度は9.91ng/mLであった。第3ウェルは原検体の36倍希釈の検体であるので、以上より原検体の濃度は357ng/mLであることがわかった。

【0022】（実施例3）次に、45例の検体について、本発明による測定方法と定量法である酵素免疫測定方法とを行い、両方法の相関図を作成し図2に示した。酵素免疫測定方法は試薬としてルミバルスHemSp（ヘモグロビン測定試薬、富士レビオ株式会社製）を用いることにより行った。この結果より、相関係数 $R = 0.954$ 、回帰式 $f(X) = 1.09X - 0.88$ （Xはルミバルス（酵素免疫測定装置、富士レビオ株式会社製）における測定値）で、本発明の測定方法と対照法との相関は非常に良好であった。

*【0023】

【発明の効果】本発明の定量方法は、簡便、安価かつ多数の検体を処理することができ、その測定は従来の間接凝集免疫測定ではできない定量を行うことができる。そのため、本発明により、前記利点に加えさらに検査結果の精度管理や治療の予後観察を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】標準液を用いて作成した検量線である。

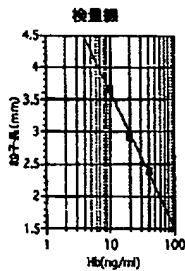
【図2】本発明の測定方法と酵素免疫測定方法との相関図である。

【図3】本発明の測定装置の一例を示す図である。

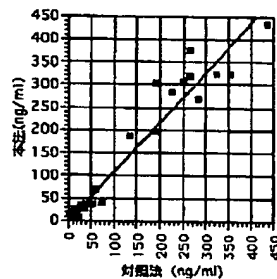
【符号の説明】

- 1 マイクロプレート供給装置
- 2 検体分注装置
- 3 試薬分注装置
- 4 検体及び試薬攪拌装置
- 5 強制沈降装置
- 6 傾斜装置
- 7 流れだしの長さ読み取り装置
- 8 濃度決定装置
- 9 マイクロプレート回収装置

【図1】



【図2】



【図3】

